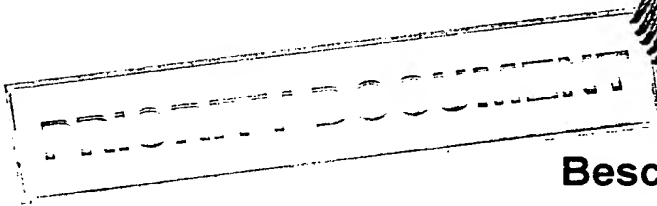


PCT/EP

97/04560

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

09/147693



REC'D	03 NOV 1997
WIPO	PCT

## Bescheinigung

Herr Professor Dr. Werner L u b i t z in Wien/Österreich  
hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Neue Systeme zur Regulation der Genexpression"

am 21. August 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-  
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die  
Symbole C 12 N, C 07 H und C 12 N der Internationalen  
Patentklassifikation erhalten.

München, den 4. September 1997

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Hoi?

Aktenzeichen: 196 33 698.8

## PATENTANWÄLTE

DIPL.-ING. **H. WEICKMANN**  
DIPL.-ING. **F. A. WEICKMANN**  
DIPL.-CHEM. **B. HUBER**  
DR.-ING. **H. LISKA**  
DIPL.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**  
DIPL.-CHEM. DR. **B. BÖHM**  
DIPL.-CHEM. DR. **W. WEISS**  
DIPL.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**  
DIPL.-PHYS. DR. **M. HERZOG**

POSTFACH 860 820  
81635 MÜNCHEN  
KOPERNIKUSSTRASSE 9  
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0  
TELEX 5 22 621  
TELEFAX (089) 4 70 50 68

Unser Zeichen:  
14954P DE/WWvs

Anmelder:  
Prof. Dr. Werner Lubitz  
Schönborngasse 12/7

1080 Wien  
Österreich

---

Neue Systeme zur Regulation der Genexpression

---

## Neue Systeme zur Regulation der Genexpression

### Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion neuer  $P_R$ - oder  $P_L$ -Operatorsequenzen aus lambdoiden Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtypsequenz unterschiedliche Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines Repressors aufweisen. Weiterhin werden neue mutierte  $P_R$ - oder  $P_L$ -Operatorsequenzen sowie deren Verwendung zur temperaturregulierten Expression von Genen und zur Herstellung verbesserter Impfstoffe offenbart.

15 Die Initiation der Transkription von der  $O_R$ - $O_L$ -Region des Bakteriophagen Lambda und anderer lambdoider Phagen wird durch einen Repressor, das Produkt des  $cI$ -Gens, negativ und positiv reguliert (siehe den Übersichtsartikel Ptashne et al., Cell 19 (1980), 1-11). In der  $O_R$ -Region überlappen drei Operatorsequenzen ( $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$  und  $O_{R3}$ ) die in unterschiedlichen Richtungen orientierten Promotoren  $P_R$  und  $P_{RM}$ .  $P_R$  steuert die Transkription von Genen, welche für den lytischen Vermehrungszyklus des Phagen verantwortlich sind, während  $P_{RM}$  der Promotor für das Lambda  $cI$ -Gen ist, welches für das Aufrechterhalten des lyso-

20 genen Zustands verantwortlich ist. Der Lambda-Repressor  $cI$  bindet kooperativ an die Operatorsequenzen  $O_{R1}$  und  $O_{R2}$  mit dem Ergebniss, daß  $P_R$  reprimiert und  $P_{RM}$  aktiviert wird.

Darüberhinaus enthält der Bakteriophage Lambda auch eine weitere Operatorregion  $O_L$ , die ebenfalls drei Operatorsequenzen ( $O_{L1}$ ,  $O_{L2}$  und  $O_{L3}$ ) enthält. Durch Bindung des  $cI$ -Repressors an diese  $O_L$ -Operatorregion kann die Expression des Lambda N-Gens vom  $P_L$ -Promotor reprimiert werden.

35 Promotoren des Bakteriophagen Lambda, insbesondere der  $P_L$ - und der  $P_R$ -Promotor, werden in der rekombinanten DNA-Technologie seit langem zur heterologen temperaturregulierten Genexpres-

sion in E.coli verwendet (vgl. Hedgpeth et al., Molec.Gen.Genet. 183 (1978), 197-203 und Bernard et al., Gene 5 (1979), 59-76; Buell et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985), 1923 und Shatzman und Rosenberg, Methods Enzymol. 152 (1987), 661). Bei diesen Expressionssystemen wird ein temperatursensitiver Lambda-Repressor cI857 verwendet, welcher die  $P_L$ - und  $P_R$ -Transkription bei geringen Temperaturen bis 30°C reprimiert, aber bei höheren Temperaturen eine Genexpression ermöglicht.

Ein Vorteil dieses Lambda-Expressionssystems besteht darin, daß die Induzierung der Genexpression auf einfache Weise durch Temperaturerhöhung bewerkstelligt werden kann und daß hierzu keine Zugabe chemischer Induktoren erforderlich ist. Ein schwerwiegender Nachteil ist jedoch, daß die Repression der Genexpression nur bis zu relativ geringen Temperaturen von maximal 30°C erfolgen, einer Temperatur, bei der ein nur langsames Bakterienwachstum stattfindet. Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, ein verbessertes System zur Lambda- $P_L$ - oder  $P_R$ -Genexpression bereitzustellen, welches eine Repression bei variablen höheren Temperaturen ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch Bereitstellung mutierter  $P_R$ - oder  $P_L$ -Operatorsequenzen aus lambdoiden Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtypoperatorsequenz unterschiedliche, insbesondere höhere Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines temperatursensitiven Repressors aufweisen. Die Erkenntnis, daß überhaupt Lambda-Expressionssysteme mit verbesserter Thermostabilität hergestellt werden können, ist höchst überraschend, da außer der temperatursensitiven Lambda cI857-Mutante keine weiteren temperatursensitiven cI-Mutanten bekannt sind, sondern nur solche Mutationen im cI-Repressor, die das Molekül resistenter gegen thermische Inaktivierung machen (Hecht et al., Proteins 1 (1986), 43-46 und Das und Mandal, Mol.Gen.Genet. 204 (1986), 540-542). Noch überraschender war, daß sich Mutationen, welche zu einer verbesserten Thermostabilität führen, in der Operator-DNA-Sequenz und nicht in der für das

Repressormolekül kodierenden DNA-Sequenz befinden. So ist beispielsweise aus der Literatur eine Mutation der Lambda-O<sub>R</sub>2-Operatorsequenz bekannt, welche zu einem völligen Verlust der Repressorbindung führt (Hawley et al., J.Biol.Chem. 260  
5 (1985), 8618-8626).

Zur Identifizierung geeigneter Mutanten wird ein Verfahren bereitgestellt, das die Selektion von mutierten O<sub>R</sub>- oder O<sub>L</sub>-Operator-DNA-Sequenzen aus lambdoiden Phagen ermöglicht, die  
10 eine im Vergleich zur Wildtypsequenz unterschiedliche Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines Repressors aufweisen, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß man (a) eine DNA-Kassette herstellt, die ein Selektionsgen unter operativer Kontrolle einer Expressionskontrollsequenz, umfas-  
15 send mindestens eine O<sub>R</sub>- oder O<sub>L</sub>-Operatorsequenz aus einem lambdoiden Phagen und einen Promotor enthält, (b) die Operator-DNA-Sequenz einer Mutagenese unterzieht und (c) die mutierten Operator-DNA-Sequenzen analysiert.

20 Die lambdoiden Phagen werden vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Phage Lambda, Phage 21, Phage 22, Phage 82, Phage 424, Phage 434, Phage D326, Phage DLP12, Phage Gamma, Phage HK022, Phage P4, Phage Phi80, Phage Phi81, Coliphage 186 und rekombinanten Variationen davon. Die genannten Phagen  
25 sind hinsichtlich des Mechanismus der Repression der Genexpression über einen cI-Repressor sehr ähnlich (Johnson et al., Nature 294 (1981), 217-223). Rekombinante Variationen der genannten Phagen, z.B. Lambda imm434 können durch Austausch einzelner Genomfragmente innerhalb der genannten Phagen erhal-  
30 ten werden (vgl. hierzu Hendricks et al., Lambda 2 (1983), R.W. Hendricks, J.W. Roberts, F.W. Stahl und R.A. Weissberg (HRSB), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Vorzugsweise wird als lambdoider Phage der Phage Lambda oder eine rekombinante Variation davon, z.B. Lambda imm434 verwendet.  
35 Besonders bevorzugt wird zur Mutagenese eine Operator-DNA-Sequenz aus den Operatorregionen O<sub>R</sub> (SEQ ID NO. 1) oder/und O<sub>L</sub> (SEQ ID NO. 3) des Phagen Lambda und insbesondere eine der

darin enthaltenen Operatorsequenzen  $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$  und  $O_{R3}$  bzw.  $O_{L1}$ ,  $O_{L2}$  und  $O_{L3}$  verwendet. Am meisten bevorzugt ist die Operatorsequenz  $O_{R2}$ .

5 Das Selektionsgen für die DNA-Kassette, welches unter operativer Kontrolle der die mutierte Operatorsequenz enthaltenden Expressionskontrollsequenz, vorzugsweise einer Lambda-Operator/Promotor-Region, gebracht wird, ist vorzugsweise ein Suizidgen, welches bei seiner Expression zum Tod der Bakterienzelle führt und somit als Selektionsmarker zur Identifizierung geeigneter Mutanten dient. Das Suizidgen soll bei einer Temperatur, bei der der Lambda-Repressor an die mutierte Operatorsequenz bindet, so stark reprimiert werden, daß eine die DNA-Kassette enthaltende Bakterienzelle wachsen kann. Bei Überschreiten der maximalen Temperatur, bei der der Repressor noch an den Operator bindet, erfolgt eine Expression des Suizidgens und eine Zerstörung der Bakterienzelle. Auf diese Weise gelingt eine einfache und direkte Selektion von geeigneten mutierten Operatorsequenzen. Ein geeignetes Suizidgen ist das E-Lysegen aus dem Phagen  $\Phi$ X174 sowie Homologe und davon abgeleitete Derivate (Hutchison und Sinsheimer, J.Mol.Biol. 18 (1966), 429-447; Witte et al., Multifunctional safety vector systems for DNA cloning, controlled expression of fusion genes, and simplified preparation of vector DNA and recombinant gene products, in BioTech Forum, Advances in Molecular Genetics 3, pp 219-239, Hrsg: Issinger, O.-G., Henke, J., Kämpf, J., Driesel, A.J., Hüthing Verlag 1991, Heidelberg). Weitere Beispiele für geeignete Lysegene sind GEF (Poulsen et al., Mol.Microbiol. 5 (1991), 1627-1637) und Kil (Reisinger et al., Virology 193 (1993), 1033-1036). Andererseits kann das Selektionsgen auch ein Reportergen, wie z.B. das  $\beta$ -Gal-Gen sein.

Die Operator-DNA-Sequenz wird zur Herstellung von Mutanten vorzugsweise einer ortsspezifischen Mutagenese mittels eines oder mehrerer Oligonucleotide beispielsweise nach der Methode von Kunkel (Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82 (1985), 488-492) unterzogen oder durch Selektion in einem Mutator-Bakterienstamm,

z.B. einem E.coli mutD oder mutL Mutatorstamm wie etwa E.coli ES1578 (Wu et al., Gene 87 (1990), 1-5) erhalten. Die Selektion der mutierten Operator-DNA-Sequenzen erfolgt vorzugsweise durch Bestimmung der Bindefähigkeit mit einem temperatursensitiven cI-Repressor, insbesondere dem temperatursensitiven cI857-Repressor. Hierzu wird die DNA-Kassette, die sich vorzugsweise auf einem Vektor befindet, in eine Bakterienzelle transformiert, die ein für einen temperatursensitiven cI-Repressor kodierendes Gen enthält. Dieses Gen kann ebenfalls auf einem Vektor vorliegen (Remaut et al., Gene 15 (1981), 81-93). Andererseits kann eine Bakterienzelle verwendet werden, die ein solches Repressorgen in seinem Chromosom enthält, z.B. E.coli M5219 (vgl. z.B. Shimatake und Rosenberg, Nature 292 (1981), 128).

Durch Kultivierung der mit einer Lysekassette transformierten Bakterienzellen, die mutierte Operator-DNA-Sequenzen enthalten, können auf einfache Weise Mutanten identifiziert werden, die bei unterschiedlich hohen Temperaturen gegenüber einer Lyse resistent sind. Bisher konnten mehrere Mutanten identifiziert werden, die bei Temperaturen bis 33°C, 35°C, 37°C und 39°C gegenüber einer Lyse resistent sind. Diese Bakterien enthalten mutierte Operator-DNA-Sequenzen, die eine Bindung des Repressors bis zu der jeweils angegebenen Temperatur ermöglichen. Ein besonders bevorzugtes Beispiel ist eine Mutante, an die der cI857-Repressor bis zu einer Temperatur von etwa 37°C bindet. Die Mutation gegenüber dem Wildtyp ist ein einziger Basenaustausch im O<sub>R</sub>2-Abschnitt der Lambda-O<sub>R</sub>-Operatorregion. Die Sequenz dieses mutierten Lambda-O<sub>R</sub>-Operators ist in SEQ ID NO. 2 gezeigt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind mutierte O<sub>R</sub>- oder O<sub>L</sub>-Operatorsequenzen aus lambdoiden Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz unterschiedliche Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines Repressors aufweisen, und die durch das oben beschriebene Selektionsverfahren erhältlich sind. Vorzugsweise besitzen die mutierten O<sub>R</sub>- oder

O<sub>L</sub>-Operatorsequenzen eine erhöhte Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines temperatursensitiven Repressors, insbesondere des temperatursensitiven cI-Repressors. Besonders bevorzugt weisen die mutierten Operatorsequenzen eine um etwa 3 bis 5 10°C, insbesondere eine um etwa 7 bis 9°C erhöhte Thermostabilität gegenüber der Wildtyp-Sequenz auf.

Da das erfindungsgemäße Selektionsverfahren vorzugsweise an O<sub>R</sub>- oder O<sub>L</sub>-Operatorsequenzen durchgeführt wird, die aus dem Phagen 10 Lambda stammen, betrifft die vorliegende Erfindung insbesondere mutierte Lambda O<sub>R</sub>- oder O<sub>L</sub>-Operatorsequenzen, die Varianten der in SEQ ID NO. 1 gezeigten O<sub>R</sub>-Operatorsequenzen oder Varianten der in SEQ ID NO. 3 gezeigten O<sub>L</sub>-Operatorsequenzen sind. Unter Variante ist in diesem Zusammenhang eine Opera- 15 torsequenz zu verstehen, die sich von der Wildtypsequenz in mindestens einer Sequenzposition durch Insertion, Deletion oder Austausch von Basen unterscheidet. Besonders bevorzugt sind die Unterschiede im Bereich der Abschnitte O<sub>R</sub>1, O<sub>R</sub>2 und O<sub>R</sub>3 bzw. O<sub>L</sub>1, O<sub>L</sub>2 und O<sub>L</sub>3. Ein spezifisches Beispiel für eine er- 20 findungsgemäße mutierte Lambda-Operatorsequenz ist die in SEQ ID NO. 2 gezeigte Lambda-O<sub>R</sub>-Operatorsequenz.

Die mutierten Operatorsequenzen erlauben die Herstellung von neuen temperaturregulierten Systemen zur Genexpression, bei 25 denen die Kultivierung von Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, im reprimierten Zustand bei variablen Temperaturen, vorzugsweise bei höheren Temperaturen als bisher, insbesondere 33 bis 39°C erfolgen kann. Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung der mutierten O<sub>R</sub>- oder O<sub>L</sub>- 30 Operatorsequenzen zur temperaturregulierten Expression von Genen in Bakterien, insbesondere in gram-negativen Bakterien wie etwa E.coli. Durch Kombination einer Wildtyp-O<sub>R</sub>- oder O<sub>L</sub>-Operatorregion und mindestens einer Operatorregion, die eine erfindungsgemäße mutierte Operatorsequenz enthält, oder durch 35 Kombination mehrerer Operatorregionen, die mutierte erfindungsgemäße Operatorsequenzen mit unterschiedlicher Thermostabilität enthalten, kann sogar eine temperaturregulierte



sequentielle Expression von Genen erreicht werden.

Vektoren und Bakterienstämme, in denen die erfindungsgemäßen mutierten Operatorsequenzen zur temperaturregulierten Expression von Genen eingesetzt werden können, sind dem Fachmann geläufig. Hier kann auf die aus dem Stand der Technik bekannten Expressionssysteme mit dem Lambda cI857-Repressor in Kombination mit einem geeigneten Promotor, z.B. dem Lambda-P<sub>L</sub> oder dem Lambda-P<sub>R</sub>-Promotor zurückgegriffen werden (vgl. z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 17.11-17.12).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nucleinsäure, umfassend eine bakterielle Expressionskontrollsequenz, d.h. eine Promotor- und Operatorregionen enthaltende Sequenz, die eine erfindungsgemäße mutierte O<sub>R</sub>- oder O<sub>L</sub>-Operatorsequenz enthält, in operativer Verknüpfung mit einer Protein-kodierenden Sequenz. Die Protein-kodierende Sequenz kann beispielsweise eine für ein eukaryontisches Protein oder Polypeptid kodierende Sequenz oder aber auch ein bakterielles Gen, z.B. das E-Lysegene sein.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie der bakteriellen Expressionskontrollsequenz in operativer Verknüpfung mit der Protein-kodierenden Sequenz enthält. Dieser Vektor kann ein beliebiger prokaryontischer Vektor sein, z.B. ein chromosomaler Vektor wie etwa ein Bakteriophage oder ein extrachromosomaler Vektor wie etwa ein Plasmid. Geeignete prokaryontische Vektoren sind z.B. bei Sambrook et al., Supra, Kapitel 1-4, beschrieben.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Bakterienzelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Zelle eine gram-

negative prokaryontische Zelle, besonders bevorzugt eine E.coli-Zelle. Vorzugsweise enthält die Zelle die Nucleinsäure oder den Vektor in ihrem Chromosom integriert und enthält weiterhin ein Gen für einen cI-Repressor aus einem lambdoiden  
5 Phagen, insbesondere das Gen für den Lambda-cI857-Repressor.

Eine besonders bevorzugte Anwendung der erfindungsgemäßen mutierten Operatoren liegt auf dem Gebiet der Impfstoffherstellung. Aus dem Stand der Technik sind sogenannte "Bakterienghosts" als Impfstoffe bekannt, d.h. Bakterienhüllen, die  
10 mittels Protein-E-induzierter Lyse aus gram-negativen Bakterien, z.B. E.coli Salmonella typhimurium, Klebsiella pneumoniae, Actinobacillus pleuropneumoniae etc. hergestellt werden konnten. Diese Ghosts, die in der Beschaffenheit ihrer Zell-  
15 oberfläche sowie den vom Immunsystem erkennbaren Repertoire an Oberflächenantigenen dem aktiven Pathogen weitgehend gleichen, rufen in verschiedenen Tiermodellen eine protektive zelluläre oder/und humorale Immunantwort hervor.

20 Die Herstellungsweise der Ghosts beruht auf der stringent kontrollierten Expression des E-Lysegens aus PhiX174, dessen Expressionsprodukt einen Tunnel durch die bakterielle Zellwandhülle ausbildet und so zum Ausströmen des Zellinhalts der Wirtszelle führt. Die Regulation dieses für die Zelle letalen  
25 Gens kann über einen Lambda-Repressor ausgeübt werden, z.B. den temperatursensitiven Lambda-Repressor cI857, der wie zuvor ausgeführt bei Temperaturen über 30°C seine Funktion verliert. Dies bedingte, daß die bisher zur Produktion von Bakterienghosts verwendeten Bakterienkulturen bei niedrigen Temperatu-  
30 ren, bevorzugt bei 28°C, angezogen werden mußten.

Gleichwohl es mit dieser Methodik zu befriedigenden Resultaten bezüglich der Immunogenität der hergestellten Ghosts gekommen ist, ist eine Verbesserung der Bakterienkultivierung dringend  
35 erstrebenswert, da das Repertoire der antigenen Determinanten auf der bakteriellen Oberfläche sich in Abhängigkeit der äußeren Bedingungen ändern kann. Da pathogene Bakterien, die

Mensch oder Tier befallen, meist in einer Umgebungstemperatur von 37 bis 39°C siedeln, sollte diese "natürliche" Umgebungstemperatur auch während des Herstellungsverfahrens von Ghosts eingehalten werden können.

5

Ein Verfahren zur Herstellung von Bakterienghosts, welches diese Aufgabe löst, wird durch Verwendung der erfindungsgemäßen mutierten Operatorsequenzen bereitgestellt. Diese Operatorsequenzen erlauben bis zu einem Temperaturbereich von vorzugsweise 35 bis 39°C das Wachstum der Bakterien und erlauben bei einer Temperaturerhöhung von 37 bis 42°C die Lyse. Dieses veränderte Lyseverhalten ermöglicht die Anzucht der Krankheitserreger nahe der Körpertemperatur des Impfkandidaten, was für die Zusammensetzung der äußeren Membran äußerst wichtig ist. Darüberhinaus kann die neue Lysekassette auch als Sicherheitskassette bei Lebendvakzinen eingesetzt werden, da z.B. im Menschen bei Induktion von Fieber (39°C) die Abtötung der Impfbakterien erfolgt.

20 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine Impfstoffzusammensetzung, die eine lebende erfindungsgemäße Bakterienzelle als Wirkstoff gegebenenfalls mit pharmazeutisch verträglichen Hilfs-, Zusatz- und Trägerstoffen enthält. Die lebende Bakterienzelle enthält eine Nucleinsäure, umfassend  
25 eine bakterielle Expressionskontrollsequenz mit einer mutierten Operatorsequenz in operativer Verknüpfung vorzugsweise mit einem Lysegen. Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Impfstoffzusammensetzung, die einen Bakterienghost als Wirkstoff gegebenenfalls mit pharmazeutisch verträglichen Hilfs-, Zusatz- und Trägerstoffen enthält, wobei der Bakterienghost durch Kultivierung einer erfindungsgemäßen Bakterienzelle bei Temperaturen von 35 - 39°C und anschließende Lyse der Bakterienzelle durch Temperaturerhöhung erhältlich ist. Als Impfstoffe geeignete Bakterienzellen sind insbesondere gram-negative Bakterien wie etwa E.coli, beispielsweise die Stämme STEC, EHEC, O78:K80, Salmonellen wie etwa S.choleraesuis, S.enteritidis und S.typhimurium, Pasteurella  
35

multocida, Pasteurella haemolytica, Bordetella bronchiseptica, Klebsiella pneumoniae, Actinobacillus pleuropneumoniae, Haemophilus influenzae, Vibrio cholerae, Helicobacter pylori, Alcaligenes eutrophus, Campylobacter jejuni und Pseudomonas aeruginosa.

Die erfindungsgemäßen modifizierten Impfstoffzusammensetzungen können oral, aerogen oder parenteral auf die Impfkandidaten übertragen werden. Dabei wird bei der Impfstoffapplikation vorzugsweise der natürliche Weg gewählt, den entsprechenden Mikroorganismen für die Infektion und die Anfangsstadien der Etablierung einer Infektionskrankheit wählen. Da bei den erfindungsgemäßen Vakzinen alle Oberflächeneigenschaften erhalten bleiben, kann durch diese Applikation eine lokale Induktion der Immunantwort erfolgen, wie sie auch beim natürlichen Infektionsprozess auftritt.

Wie oben ausgeführt, können durch Anwendung erfindungsgemäßer mutierter Operatorsequenzen Vakzine entwickelt werden, die bei Überschreiten einer Sollwert-Temperatur kontrolliert lysiert werden. Weiterhin kann jedoch auch eine kältesensitive Suizidkassette bereitgestellt werden, die gram-negative Bakterien, die als Lebendvakzine eingesetzt werden, bei Freisetzung in die Umwelt abtötet. So kann durch Kombination von zwei genetischen Regulationssystemen ein Absterben der Bakterien bei Unterschreiten eines Sollwerts der Umgebungstemperatur durch Expression des Suizidgens erfolgen. Diese Sicherheitskassette gewährleistet die Abtötung von Lebendvakzinen auch bei einer Ausscheidung aus dem Organismus.

Die Erfindung betrifft somit eine Nucleinsäure, umfassend (a) eine erste bakterielle Expressionskontrollsequenz, die eine  $O_R$ - oder  $O_L$ -Operatorsequenz aus einem lambdoiden Phagen enthält und an die ein erster temperatursensitiver  $cI$  Repressor aus lambdoiden Phagen binden kann, in operativer Verknüpfung mit einer für einen zweiten Repressor kodierenden Sequenz, wobei der zweite Repressor nicht an die erste bakterielle Expres-

sionssequenz binden kann, und (b) eine zweite bakterielle Expressionskontrollsequenz, an die der zweite Repressor binden kann, in operativer Verknüpfung mit einem Suizidgen.

- 5 Die Komponenten (a) und (b) können kovalent miteinander verknüpft, z.B. auf einen einzigen Vektor, vorliegen oder auch voneinander getrennt, z.B. auf unterschiedlichen Vektoren, sein, oder getrennt oder gemeinsam auf dem Chromosom eines Empfängerbakteriums lokalisiert sein.

10

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Bakterienzelle, die mindestens eine Kopie einer wie zuvor definierten Nucleinsäure enthält. Weiterhin enthält die Bakterienzelle zweckmäßigerweise ein Gen für den ersten Repressor.

- 15 Der erste Repressor ist vorzugsweise der temperatursensitive cI857-Repressor.

Die erfindungsgemäße Sicherheitskassette enthält vorzugsweise ein Gen, welches für einen temperatursensitiven cI-Repressor,

- 20 z.B. den Repressor cI857 kodiert, und ein Gen, das für einen zweiten Repressor kodiert, wobei dieses Gen unter Kontrolle einer Lambda-Promotor/Operator-Region steht, an die der temperatursensitive Repressor bindet. Der zweite Repressor steuert wiederum die Expression eines anderen Gens, z.B. eines Suizidgens, wie das E-Lysegens. Bei 37°C ist der temperatursensitive Lambda-Repressor inaktiv, so daß der zweite Repressor exprimiert wird, wodurch wiederum die Expression des Suizidgens reprimiert wird.

- 30 Bei Verringerung der Temperatur bindet der temperatursensitive Lambda-Repressor an den Operator, so daß die Expression des zweiten Repressors blockiert wird, was zu einer Expression des Suizidgens führt. Bevorzugt ist für diese Sicherheitskassette eine erste Expressionskontrollsequenz, die den mutierten Lambda-Operator enthält, da hierbei eine bessere und schnellere Aktivierung des Suizidgens erhalten wird.
- 35

Der zweite Repressor kann ein beliebiger Repressor sein, ein lac-Repressor. Bevorzugt ist jedoch die Verwendung eines weiteren Repressors aus lambdoiden Phagen, z.B. cI aus dem Phagen 434, der nicht temperatursensitiv ist und an eine eigene Operatorsequenz, aber nicht an die vom Lambda-Repressor cI857 erkannte Sequenz bindet.

Besonders bevorzugt ist es, für die Entwicklung von Lebendimpfstoffen sowohl eine Hitze- als auch ein Kältere Regulations-  
10 element einzubauen. Dieses Einbauen erfolgt vorzugsweise durch homologe Rekombination in das Chromosom des Impfbakteriums.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch eine Bakterienzelle, die neben den beiden Komponenten (a) und (b) als Komponente (c) eine dritte bakterielle Expressionskontrollsequenz,  
15 die eine erfindungsgemäße mutierte Operatorsequenz enthält, in operativer Verknüpfung mit einem Suizidgen umfaßt.

Auch diese Bakterienzellen können in Impfstoffzusammensetzungen insbesondere für Lebendvakzine eingesetzt werden. Auf  
20 diese Weise können wärme- oder/und kälteempfindliche Sicherheitslebendvakzine bereitgestellt werden, die bei einer Erhöhung der Körpertemperatur des Impfkandidaten, z.B. durch Fieber, oder/und bei Ausscheidung in die Umgebung zu einem Absterben der Impfbakterien führen.  
25

Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Figuren, Sequenzprotokolle und Beispiele erläutert werden.

30 Es zeigen:

Fig. 1a die schematische Darstellung einer Lysekassette des Standes der Technik, umfassend eine Lambda-O<sub>R</sub>-Wildtyp-Region, das Lambda-cI857-Gen unter Kontrolle des Promotors P<sub>RM</sub> und das E-Lysegen unter Kontrolle des Promotors P<sub>R</sub>;  
35

- Fig. 1b die schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Lysekassette, die eine mutierte Lambda- $O_R$ -Sequenz enthält;
- Fig. 2a die schematische Darstellung einer kälteempfindlichen Sicherheitskassette, umfassend eine Wildtyp (pCS1) bzw. mutierte (pCSJ1)  $O_R$ -Operatorsequenz, das Lambda-cI857-Gen unter Kontrolle des Promotors  $P_{RM}$ , das Gen des lacI-Repressors unter Kontrolle von  $P_R$  und das E-Lyseggen unter Kontrolle des lac-Promotor/-Operatorsystems, bei einer Temperatur, bei der der temperatursensitive Lambda-Repressor cI857 nicht an die Lambda  $O_R$ -Sequenz bindet;
- Fig. 2b die schematische Darstellung der Sicherheitskassette gemäß Fig. 2a bei einer Temperatur, bei der der Lambda-Repressor cI857 an den Lambda  $O_R$ -Operator bindet;
- Fig. 3 die Lysekurve von Bakterienzellen (optische Dichte gegen Zeit), die ein Plasmid mit der in Fig. 1b gezeigten Lysekassette enthalten;
- Fig. 4 die Lysekurve einer Bakterienzelle, die eine kältesensitive Sicherheitskassette mit dem Wildtyp  $O_R$ -Operator enthält und
- Fig. 5 ein Vergleich der Lysekurven von Bakterienzellen, die eine kältesensitive Sicherheitslysekassette mit dem Wildtyp  $O_R$ -Operator (pCS1) bzw. dem mutierten Operator (pCSJ1) enthalten,
- Fig. 6a die schematische Darstellung einer kältesensitiven Sicherheitskassette, umfassend eine Wildtyp (pCS2) bzw. mutierte (pCSJ2)  $O_R$ -Operatorsequenz, das Lambda-cI857-Gen unter Kontrolle des Promotors  $P_{RM}$ , das Gen des Phage 434 cI-Repressors unter Kontrolle von Lambda  $P_R$  und das E-Lyseggen unter Kontrolle des 434  $O_R$  ( $P_{RM}$ - $P_R$ ) Promotor/Operator-Systems, bei einer Temperatur, bei der der temperatursensitive Lambda-Repressor cI857 nicht an die Lambda- $O_R$ -Sequenz bindet,
- Fig. 6b die schematische Darstellung der Sicherheitskassette gemäß Fig. 6a bei einer Temperatur, bei der der

Lambda-Repressor cI857 an den Lambda O<sub>R</sub>-Operator bindet;

5 SEQ ID NO. 1 die Nucleotidsequenz des Lambda-O<sub>R</sub>-Operators;  
die Operatorsequenz O<sub>R</sub>3 reicht von Position 11  
- 27; die Operatorsequenz O<sub>R</sub>2 reicht von Posi-  
tion 34 - 41; die Operatorsequenz O<sub>R</sub>1 reicht  
von Position 58 - 74;

10 SEQ ID NO. 2 die Nucleotidsequenz eines mutierten Lambda-O<sub>R</sub>-  
Operators, die gegenüber der Wildtypsequenz  
einen Austausch von T → C an Position 42 auf-  
weist;

15 SEQ ID NO. 3 die Nucleotidsequenz des Lambda-O<sub>L</sub>-Operators;  
die Operatorsequenz O<sub>L</sub>3 reicht von Position 11  
- 27; die Operatorsequenz O<sub>L</sub>2 reicht von Posit-  
ion 31 - 47; die Operatorsequenz O<sub>L</sub>1 reicht von  
Position 55 - 70;

SEQ ID NO. 4 und 5  
20 ein 1601 bp langes DNA-Fragment des Plasmids  
pAW12; bp 1 - 983 stammen aus dem Bakteriophagen  
Lambda (Position 37125 - 38107; vgl. Sanger et  
al., J.Mol.Biol. 162 (1982), 729-773) und ent-  
halten das Lambda-cI857-Gen sowie die mutierte  
25 O<sub>R</sub>-Operatorregion (Mutation an Position 858 T →  
C); bp 1023 - 1601 stammen aus dem Phagen  
PhiX174 (Position 447 - 1026; vgl. Sanger et  
al., J.Mol.Biol. 125 (1978), 225-246) und ent-  
halten das E-Lysegen;

30 SEQ ID NO. 6 und 7  
ein 2834 bp langes DNA-Fragment des Plasmids  
pCSJ; bp 1 - 983 stammen aus dem Bakteriophagen  
Lambda (Position 37125 - 38107) und enthalten  
das cI857-Gen sowie die mutierte Lambda-O<sub>R</sub>-Re-  
35 gion (Mutation an Position 858 T → C); bp 990 -  
2230 stammen aus dem E.coli lac-Operon subklo-  
niert auf dem Plasmid pMC7 (Calos, Nature 274  
(1978), 762-765) und enthalten das lacI-Repres-



sorgen und den lac-Promotor/Operator; bp 2256-2834 stammen aus dem Bakteriophagen PhiX174 (Position 447 - 1026) und enthalten das E-Lysegem.

5

## BEISPIELE

### Beispiel 1:

#### 10 1.1. Random-Mutagenese der Lambda-O<sub>R</sub>-Operatorregion

Als Ausgangsmaterial wurde das Plasmid pAW12 (Witte und Lubitz, Eur.J.Biochem. 180 (1989), 393-398) gewählt, welches das Lysegem E aus dem Bakteriophagen PhiX174 unter Kontrolle des  
15 Lambda-P<sub>R</sub>-Promotors sowie das zugehörige Repressorgen cI857 enthält. Ziel dieses Versuchs war eine Veränderung der Lysekassette, so daß das Lysegem E nicht bereits bei 30°C, sondern bei höheren Temperaturen aktiviert wird. Hierzu wurde der E.coli Mutatorstamm ES1578 (Wu et al., (1990), supra) mit dem  
20 Lyseplasmid transformiert und eine Selektion auf Klone mit einem veränderten Temperaturprofil der Zellyse durchgeführt.

Dabei wurden die aus der Transformation hervorgegangenen mutierten Klone nach Überstempeln auf Testplatten mit Lyseselektivmedium (LB mit 1% SDS) und Inkubation bei unterschiedlichen  
25 Temperaturen (z.B. 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C) erkannt. Durch Plasmidextraktion und anschließende Transformation in einen Nicht-Mutatorstamm wurde das veränderte Lyseprofil der Lysekassette in Flüssigkultur genau  
30 bestimmt.

Die Art der Mutation wurde durch Subklonierung der mutagenisierten Lysekassetten in ein Sequenzierplasmid bestimmt. Zusätzlich wurde zur funktionellen Prüfung das Lysegem E gegen  
35 das  $\beta$ -Galactosidasegen ausgetauscht. Anhand eines einfachen  $\beta$ -Gal-Tests konnte dann quantitativ der reprimierte oder aktive Zustand der Genkassette gemessen werden.

Auf diese Weise konnten mehrere Klone mit einem unterschiedlichen Temperaturlyseprofil erhalten werden. Diese Klone erlaubten in einem Temperaturbereich von 33-39°C das Wachstum der Bakterien und führten erst bei einer weiteren Temperaturerhöhung auf 37-42°C zur Lyse der Bakterien.

Durch Sequenzierung eines mutierten Klons, der eine Temperaturbeständigkeit bis 37°C aufweist, wurde eine Mutation der O<sub>R</sub>-Operatorregion (SEQ ID NO. 2) identifiziert.

10

### 1.2. Verifizierung der Mutation

Zur Verifizierung der in Beispiel 1.1. erhaltenen Mutation wurde eine ortsspezifische Mutagenese der Lambda O<sub>R</sub>-Wildtypsequenz unter Verwendung eines Oligonucleotids durchgeführt.

Die Mutagenese wurde ausgeführt nach dem Protokoll von Kunkel (Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82 (1985), 488-492).

20 4 ml Übernachtskultur des E.coli-Stammes CJ236 (dut<sup>-</sup>, ung<sup>-</sup>) wurden in 50 ml LB-Medium (+ 10 µg/ml Chloramphenicol und 0,25 µg/ml Uridin) gegeben und 30 min bei 37°C geschüttelt. Dann wurden 100 µl M13-Phagen zugesetzt und 6 h bei 37°C inkubiert.

25 Die Kultur wurde in 2 SS34-Zentrifugenröhrchen 10 min bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert, der Überstand in neue Röhrchen dekantiert und zur weiteren Reinigung nochmals zentrifugiert.

30 Durch Zugabe von 5 ml 5x Polyethylenglycol/NaCl wurden die Phagen 1 h bei 4°C gefällt. Dann wurde 10 min bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Pellet wurde getrocknet, in 0,8 ml TES-Puffer (0,1 M Tris HCl, pH 8; 0,3 M NaCl; 1mM EDTA) suspendiert und 1 h bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde auf 2 Eppendorfgefäße aufgeteilt und 5 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Der Überstand, in

dem sich die aufgebrochenen Phagen befanden, wurde abgenommen und einer Phenol/Chloroform-Extraktion zur Gewinnung der DNA unterzogen. Die resultierende DNA wurde mit dem 2,5-fachen Volumen 96% Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in  
5 60  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Ein Oligonucleotid mit der Sequenz  
5'-GTA AAA TAG TCA ACA CGC GCG GTG TTA GAT ATT TAT C-3' wurde phosphoryliert. Hierzu wurden 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 20  $\mu$ l Oligonucleotid  
10 (20 ng), 4,5  $\mu$ l Kinase-Puffer (Stratagene) und 0,5  $\mu$ l Polynucleotidkinase (5 U, Stratagene) 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden 7  $\mu$ l 0,1 M EDTA zugegeben und 10 min auf 65°C erhitzt.

Zum Annealing wurden 20  $\mu$ l phosphoryliertes Oligonucleotid,  
15 3,5  $\mu$ l einzelsträngige DNA-Matrize (1  $\mu$ g ssDNA wie zuvor beschrieben hergestellt) und 1,4  $\mu$ l 20 x SSC-Puffer 5 min auf 70°C erhitzt, langsam bis 25°C abgekühlt und dann auf Eis gestellt.

20 Zur Extension wurden 10  $\mu$ l des Reaktionsgemisches aus dem Annealingansatz, 37,5  $\mu$ l XL-Puffer (27 mM Hepes pH 7,8, jeweils 5 mM dNTP, 13 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,7 mM Dithiothreitol, 1,3 mM ATP, 1  $\mu$ l Ligase (1 U, Boehringer Mannheim), 1,5  $\mu$ l T4-Polymerase (1,5 U, Boehringer Mannheim), 1,5  $\mu$ l T4-Gen32-Protein (8  
25  $\mu$ g, Boehringer Mannheim) 10 min auf Eis, 10 min bei Raumtemperatur und 2 h bei 37°C inkubiert. Nach 1 h erfolgte die Zugabe von 1  $\mu$ l Ligase und 1  $\mu$ l T4-DNA-Polymerase. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 3  $\mu$ l 0,25 M EDTA gestoppt.

30 Zur Transformation wurden 100  $\mu$ l kompetente E.coli Zellen JM103 (Messing et al., Nucleic Acids.Res. 9 (1981), 309-321) mit 10  $\mu$ l DNA aus dem Extensionsansatz versetzt und 1 h oder mehr auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2,5 min bei  
35 42°C wurden 0,2 ml frische JM103-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zugesetzt. Die Zellen wurden mit 3 ml Soft Agar vermischt und auf eine LB-Agarplatte ausgeimpft. Anschließend

erfolgte Inkubation über Nacht bei 37°C.

Zur Identifizierung der Mutanten wurden mit einer Pasteurpipette Plaques ausgestochen und in 5 ml LB-Medium, dem 400 µl einer Übernachtskultur von E.coli JM103 zugesetzt wurden, angeimpft. Nach 3 h Wachstum bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert. Aus dem Zellpellet wurden mittels Plasmidpräparation doppelsträngige M13-Plasmide gewonnen. Aus dem Überstand können einzelsträngige M13-Phagen isoliert werden.

10

### Beispiel 2:

#### Analyse der mutagenisierten Lysekassetten

15 Die Figuren 1 und 2 zeigen unterschiedliche E-spezifische Lysekassetten mit verschiedenen Temperaturinduktionen der Lysefunktion.

In Fig. 1a, welches die Wildtyp-Lambda-O<sub>R</sub>-Operatorsequenz enthält, erfolgt bis 30°C eine Repression der Funktion des E-Lysegens durch das cI857-kodierte Repressorprotein am vorgeschalteten Lambda-P<sub>E</sub>-Promotor/Operatorbereich. Bei Temperaturen über 30°C werden cI857-spezifische Repressormoleküle thermisch inaktiviert und die Expression des E-Gens induziert. Fig. 1b zeigt das Plasmid pAWJ12, welches eine mutierte Operatorsequenz (SEQ ID NO. 2) enthält, so daß die Repression der Lysefunktion des Gens E mit Hilfe von cI857 bis 37°C erfolgt und eine Induktion der Lysefunktion erst bei 39°C oder höher erfolgt.

30

In Fig. 2 ist die Funktion einer kältesensitiven Sicherheitskassette erläutert. Fig. 2a zeigt, daß in den Plasmiden pCS1 (Wildtypoperator) und pCSJ1 (mutierter Operator) bei einer Temperatur von  $\geq 32^\circ\text{C}$  (pCS1) bzw.  $\geq 39^\circ\text{C}$  (pCSJ1) die Bildung von lacI-spezifischen Repressormolekülen induziert wird, die wiederum die Expression des E-Gens reprimieren. Bei einer Temperatur unterhalb von 30°C (pCS1) bzw. 37°C (pCSJ1) kommt

35

es zur Ausbildung von funktionsfähiger cI857-Repressormoleküle, die die Bildung von lacI-spezifischen Repressormolekülen unterbinden und so die Expression des E-Gens freigeben (Fig. 2b). Im Plasmid pCSJ1 erfolgt die einhergehende Zellyse  
s schneller als in pCS1.

Fig. 3 zeigt die Lysekurve einer das Plasmid pAWJ12 (mutierter Operator) enthaltenden Bakterienzelle. 3 Stunden nach Beginn der Kultivierung wurde die Temperatur von 37°C in einem Ali-  
10 quot der Bakterienzellen beibehalten, und in zwei anderen Aliquots auf 38 bzw. 42°C erhöht. Bei 37°C findet man ein weiteres Wachstum der Bakterien, während bei 38°C bereits eine Lyse stattfindet. Bei 42°C ist die Lyse deutlich verstärkt.

15 Die Figuren 4 und 5 zeigen die Funktion einer kältesensitiven Sicherheitskassette. In Fig. 4 wurden Bakterienzellen, die das Plasmid pCS1 (Wildtypoperator) enthielten, einer Temperaturänderung von 37 auf 28°C ausgesetzt. Diese Temperaturverring-  
erung führte zu einem Anschalten des E-Lysegens und zu einem  
20 Absterben der Zellen (Abnahme der optischen Dichte).

Fig. 5 zeigt einen Vergleich der Lysegeschwindigkeit von Bak-  
terien, die das Plasmid pCS1 (Wildtypoperator) und das Plasmid  
pCSJ1 (mutierter Operator) enthalten. Es ist zu erkennen, daß  
25 die Lyse bei den Bakterien, welche den mutierten Operator  
enthalten, wesentlich schneller stattfindet.

Fig. 6 zeigt eine weitere kältesensitive Sicherheitskassette. Die Plasmide pCS2 (Wildtyp-Operator) und pCSJ2 (mutierter  
30 Operator) zeigen bei Temperaturen, bei denen der Lambda cI857-Repressor nicht an den Operator bindet, die Bildung von cI-434 Repressormolekülen, die die Expression des E-Gens reprimieren (Fig. 6a). Bei einer Temperatur, bei der der cI857-Repressor  
an den Lambda-Operator bindet, wird die Bildung von cI-434-  
35 spezifischen Repressormolekülen unterbunden und so die Expres-  
sion des E-Gens freigegeben (Fig. 6b).

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektion von mutierten  $O_R$ - oder  $O_L$ -Operator-DNA-Sequenzen aus lambdoiden Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtysequenz unterschiedliche Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines Repressors aufweisen,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man
  - (a) eine DNA-Kassette herstellt, die ein Selektionsgen unter operativer Kontrolle einer Expressionskontrollsequenz, umfassend mindestens ein  $O_R$ - oder  $O_L$ -Operatorsequenz aus einem lambdoiden Phagen und einem Promotor enthält,
  - (b) die Operator-DNA-Sequenz einer Mutagenese unterzieht und
  - (c) die mutierten Operator-DNA-Sequenzen analysiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die lambdoiden Phagen ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Phage Lambda, Phage 21, Phage 22, Phage 82, Phage 424, Phage 434, Phage D326, Phage DLP12, Phage Gamma, Phage HK022, Phage P4, Phage Phi80, Phage Phi81, Coliphage 186 und rekombinanten Variationen davon.
3. Verfahren nach Anspruch 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Phage Lambda oder rekombinante Variationen davon verwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man die eine Operator-DNA-Sequenz aus den Operatorregionen  $O_R$  oder/und  $O_L$  des Phagen Lambda verwendet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man als Selektionsgen das E-Lysegen aus dem Phagen  
PhiX174 verwendet.
- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man die Operator-DNA-Sequenz einer ortsspezifischen  
Mutagenese durch Oligonukleotide unterzieht oder eine  
10 Selektion in einem Mutator-Bakterienstamm durchführt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Analyse der mutierten Operator-DNA-Sequenzen  
15 durch Bestimmung der Bindefähigkeit mit einem temperatur-  
sensitiven cI-Repressor erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 7,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
20 daß man den temperatursensitiven Lambda-Repressor cI857  
verwendet.
9. Mutierte  $O_R$ - oder  $O_L$ -Operatorsequenzen aus lambdoiden  
Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtypsequenz unter-  
25 schiedliche Thermostabilität hinsichtlich der Bindung  
eines Repressors aufweisen, erhältlich durch ein Verfah-  
ren nach einem der Ansprüche 1 - 8.
10. Mutierte  $O_R$ - oder  $O_L$ -Operatorsequenzen aus lambdoiden  
30 Phagen, die eine im Vergleich zur Wildtypsequenz erhöhte  
Thermostabilität hinsichtlich der Bindung eines tempera-  
tursensitiven Repressors aufweisen, erhältlich durch ein  
Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8.
- 35 11. Mutierte  $O_R$ - oder  $O_L$ -Operatorsequenz nach Anspruch 10,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie eine um etwa 3 - 10°C erhöhte Thermostabilität

aufweist.

12. Mutierte  $O_R$ - oder  $O_L$ -Operatorsequenz nach Anspruch 10,  
dadurch gekennzeichnet,  
5 daß sie eine um etwa 7 - 9°C erhöhte Thermostabilität aufweist.
13. Mutierte Lambda- $O_R$ - oder  $O_L$ -Operatorsequenz nach einem der  
Ansprüche 9 - 12, die eine Variante der in SEQ ID NO. 1  
10 oder SEQ ID NO. 3 gezeigten Sequenzen ist.
14. Mutierte Lambda- $O_R$ -Operatorsequenz, umfassend die in SEQ  
ID NO. 2 gezeigte Sequenz.
- 15 15. Verwendung einer mutierten  $O_R$ - oder  $O_L$ -Operatorsequenz  
nach einem der Ansprüche 9 - 14 zur temperaturregulierten  
Expression von Genen in Bakterienzellen.
16. Verwendung einer Kombination von (a) einer Wildtyp- $O_R$ -  
20 oder  $O_L$ -Operatorregion und mindestens einer Operatorre-  
gion, die eine mutierte  $O_R$ - oder  $O_L$ -Operatorsequenz nach  
einem der Ansprüche 9 - 14 enthält, oder (b) mehreren  
Operatorregionen, die mutierte  $O_R$ - oder  $O_L$ -Operatorsequen-  
zen nach einem der Ansprüche 9 - 14 enthalten, mit unter-  
25 schiedlicher Thermostabilität zur temperaturregulierten  
sequentiellen Expression von Genen.
17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
30 daß die Bakterienzellen zur Regulation der Genexpression  
ein Gen für einen cI-Repressor aus lambdoiden Phagen  
enthalten.
18. Verwendung nach Anspruch 17,  
35 dadurch gekennzeichnet,  
daß die Bakterienzellen das Gen für den Lambda-cI857-  
Repressor enthalten.



19. Nucleinsäure, umfassend eine bakterielle Expressionskontrollsequenz, die eine mutierte  $O_R$ - oder  $O_L$ -Operatorsequenz nach einem der Ansprüche 9 - 14 enthält, in operativer Verknüpfung mit einer Protein-codierenden Sequenz.
- 5 20. Nucleinsäure nach Anspruch 19,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Protein-codierende Sequenz ein Suizidgen ist.
- 10 21. Nucleinsäure nach Anspruch 20,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Expressionskontrollsequenz einen Lambda- $P_L$ - oder  $P_R$ -Promotor enthält.
- 15 22. Vektor,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß er mindestens eine Kopie einer Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 19 - 21 enthält.
- 20 23. Vektor nach Anspruch 22,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß er ein bakterieller chromosomaler Vektor ist.
24. Vektor nach Anspruch 22,  
25 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß er ein bakterielles extrachromosomales Plasmid ist.
25. Bakterienzelle,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
30 daß sie mit einer Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 19 - 21 oder einem Vektor nach einem der Ansprüche 22 - 24 transformiert ist.
26. Bakterienzelle nach Anspruch 25,  
35 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie die Nucleinsäure oder den Vektor in ihrem Chromosom integriert enthält.

27. Bakterienzelle nach Anspruch 25 oder 26,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie weiterhin ein Gen für einen cI-Repressor aus  
lambdoiden Phagen enthält.
- 5 28. Bakterienzelle nach Anspruch 27,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie das Gen für den Lambda cI857 Repressor enthält.
- 10 29. Impfstoffzusammensetzung,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie eine lebende Bakterienzelle nach einem der An-  
sprüche 26 - 28 als Wirkstoff gegebenenfalls mit pharma-  
zeutisch verträglichen Hilfs-, Zusatz- und Trägerstoffen  
15 enthält.
30. Impfstoffzusammensetzung,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie einen Bakterienghost als Wirkstoff gegebenenfalls  
20 mit pharmazeutisch verträglichen Hilfs-, Zusatz- und  
Trägerstoffen enthält, wobei der Bakterienghost durch  
Kultivierung einer Bakterienzelle nach einem der  
Ansprüche 25 - 28 bei Temperaturen von 35 - 39°C und an-  
schließende Lyse der Bakterienzelle durch Temperaturerhö-  
35 hung erhältlich ist.
31. Nucleinsäure, umfassend (a) eine erste bakterielle Ex-  
pressionskontrollsequenz, die eine O<sub>R</sub>- oder O<sub>L</sub>-Operator-  
sequenz aus einem lambdoiden Phagen enthält und an die  
30 ein erster cI Repressor aus lambdoiden Phagen binden  
kann, in operativer Verknüpfung mit einer für einen zwei-  
ten Repressor kodierenden Sequenz, wobei der zweite Re-  
pressor nicht an die erste bakterielle Expressionssequenz  
binden kann, und (b) eine zweite bakterielle Expressions-  
35 kontrollsequenz, an die der zweite Repressor binden kann,  
in operativer Verknüpfung mit einem Suizidgen.

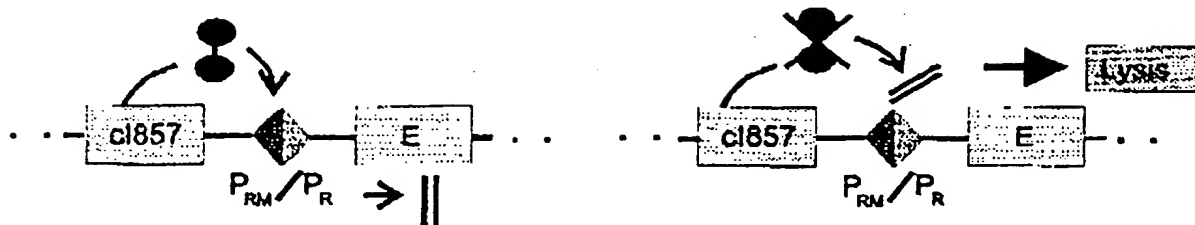
32. Bakterienzelle,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie mindestens eine Kopie einer Nucleinsäure nach  
Anspruch 31 enthält.
- 5 33. Bakterienzelle nach Anspruch 32,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie weiterhin ein Gen für den ersten Repressor ent-  
hält.
- 10 34. Bakterienzelle nach Anspruch 32 oder 33,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die erste bakterielle Expressionskontrollsequenz eine  
mutierte Operatorsequenz nach einem der Ansprüche 9 - 14  
15 enthält.
35. Bakterienzelle nach einem der Ansprüche 32 - 34, weiter-  
hin umfassend (c) eine dritte bakterielle Expressionskon-  
trollsequenz, die eine mutierte Operatorsequenz nach  
20 einem der Ansprüche 9 - 14 enthält, in operativer Ver-  
knüpfung mit einem Suizidgen.
36. Impfstoffzusammensetzung,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
25 daß sie eine lebende Bakterienzelle nach einem der An-  
sprüche 32 - 35 als Wirkstoff gegebenenfalls mit pharma-  
zeutisch verträglichen Hilfs-, Zusatz- und Trägerstoffen  
enthält.
- 30 37. Verwendung von Impfstoffzusammensetzungen nach Anspruch  
29 oder 36 als wärme- oder/und kälteempfindliche Sicher-  
heitslebendvakzine.

### Zusammenfassung

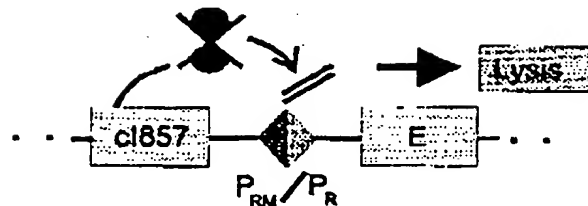
Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion  
5 neuer  $P_R$ - oder  $P_L$ -Operatorsequenzen aus lambdoiden Phagen, die  
eine im Vergleich zur Wildtypsequenz unterschiedliche Thermo-  
stabilität hinsichtlich der Bindung eines Repressors aufwei-  
sen. Weiterhin werden neue mutierte  $P_R$ - oder  $P_L$ -Operatorsequen-  
zen sowie deren Verwendung zur temperaturregulierten Expres-  
10 sion von Genen und zur Herstellung verbesserter Impfstoffe  
offenbart.

/users/vs/anm/14954 21.08.1996

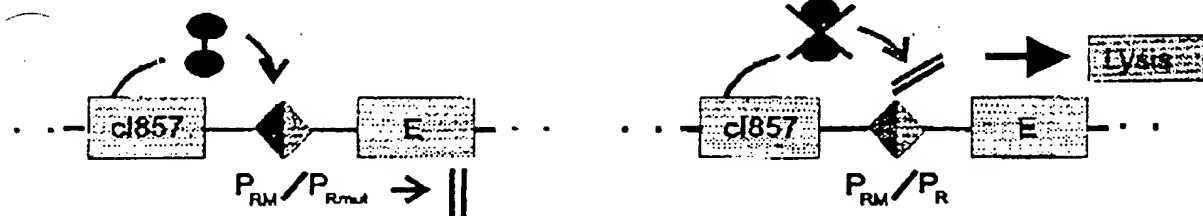
1a) pAw12  $\leq 30^{\circ}\text{C}$



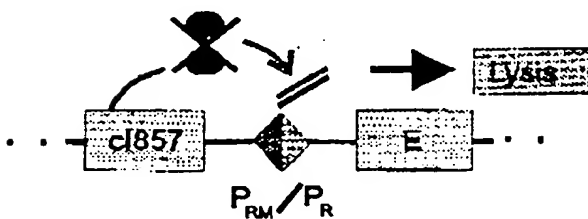
$\geq 30^{\circ}\text{C}$



b) pAWJ12  $\leq 37^{\circ}\text{C}$

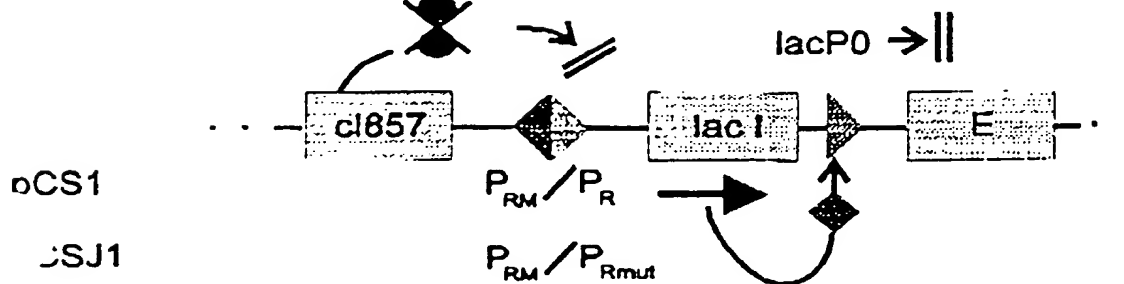


$\geq 39^{\circ}\text{C}$



2a)

$\geq 32^{\circ}\text{C}$

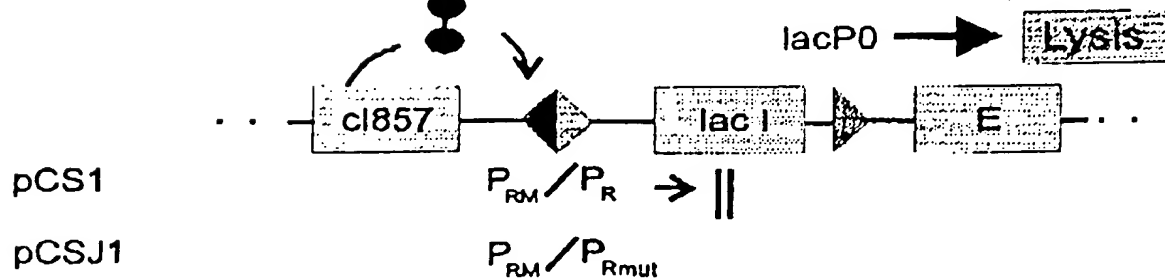


oCS1

CSJ1

2b)

$\leq 30^{\circ}\text{C}$



pCS1

pCSJ1

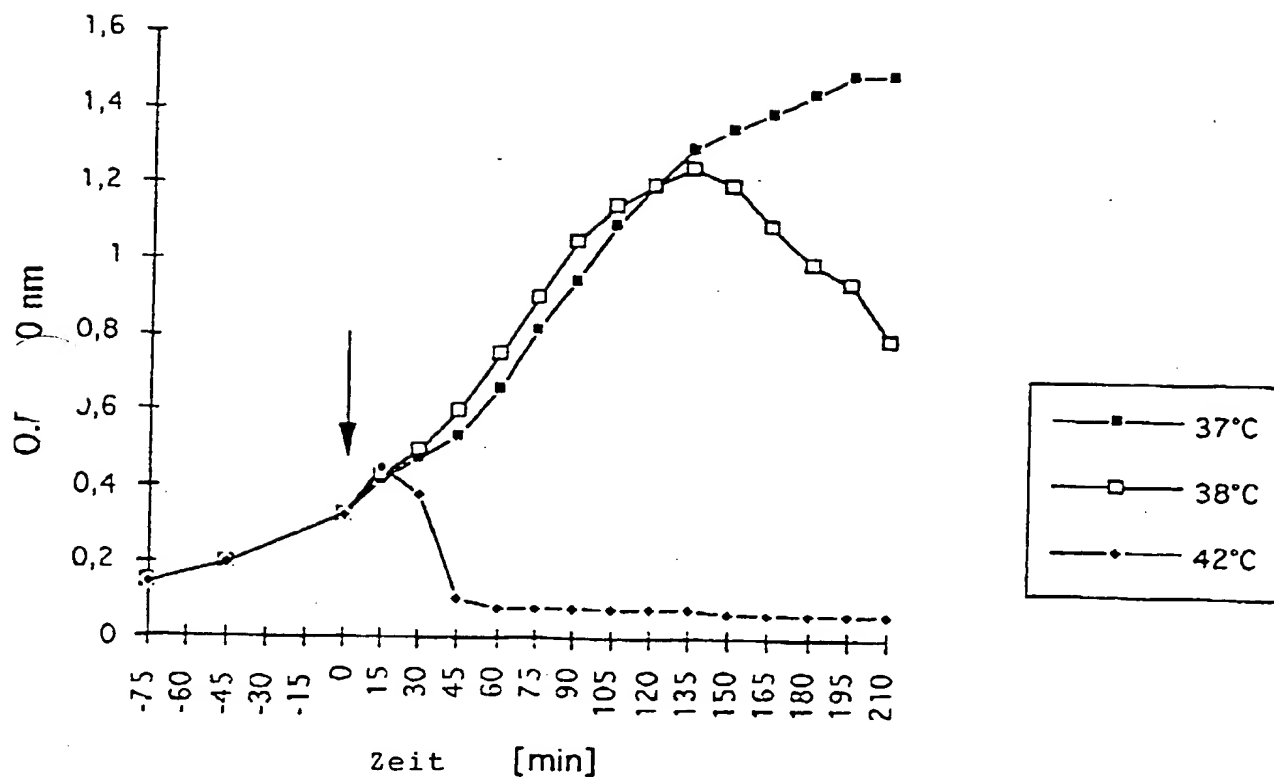


Fig. 3: Wachstum von *E. coli* NM522(pAWJ12) bei Temperaturänderung von 28°C auf höhere Temperaturen (↓)

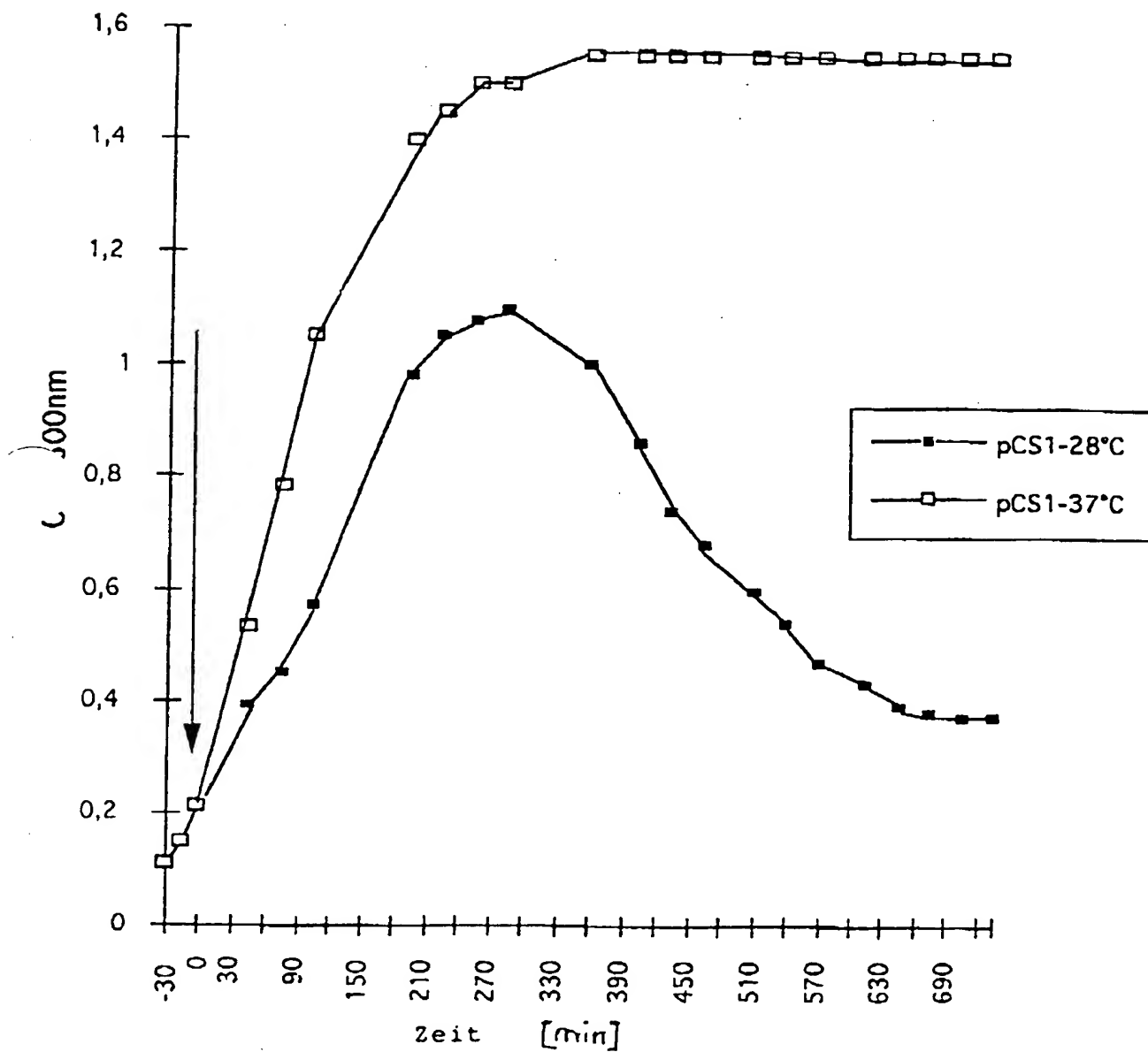


Fig. 4: Wachstum von *E. coli* MC4100(pCS1) bei Temperaturänderung von 37°C auf 28°C (↓)

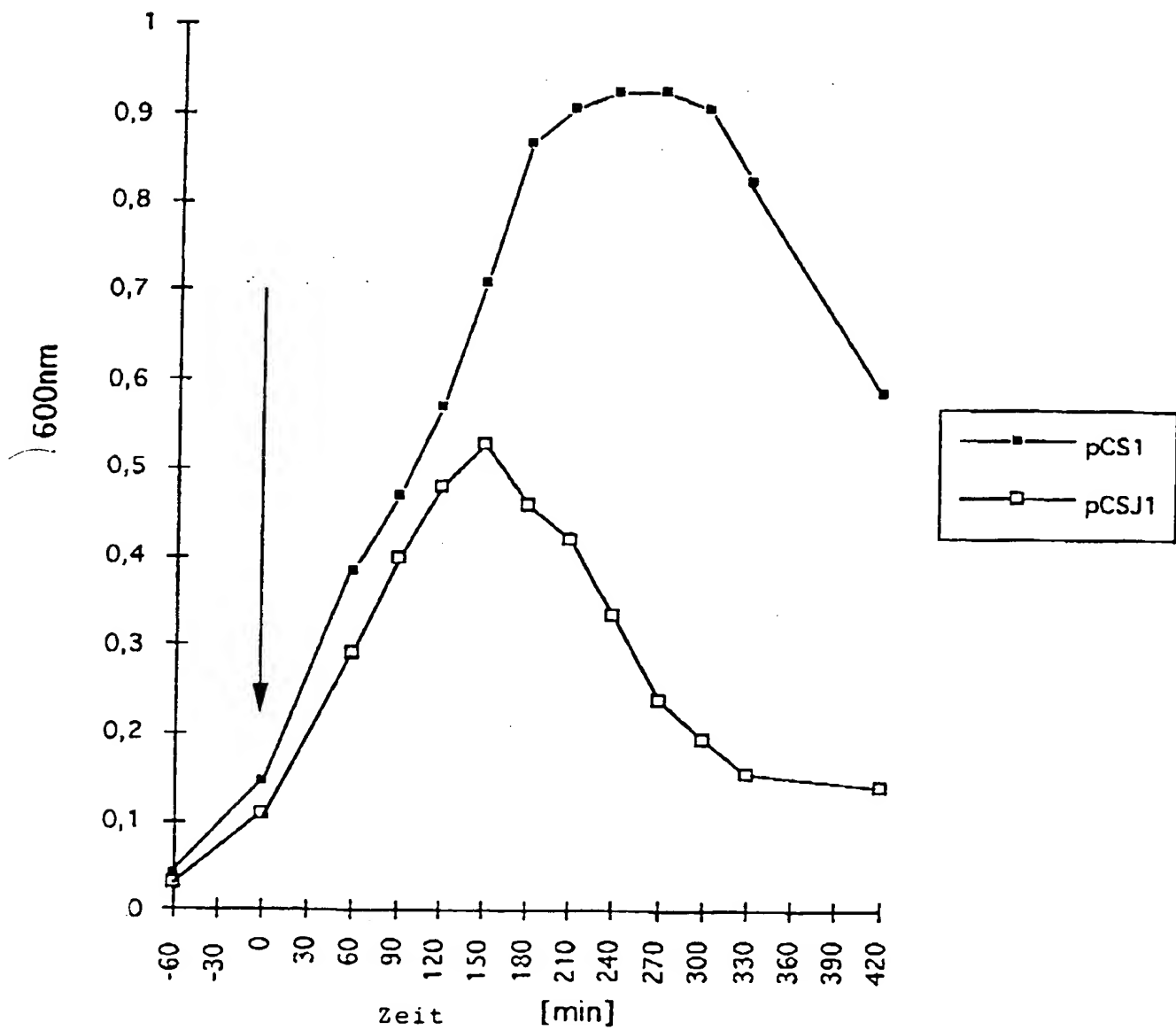


Fig. 5: Wachstum von E.coli MC4100(pCS1) und MC4100(pCSJ1) bei Temperaturänderung von 37°C auf 28°C (↓)



Fig. 6a

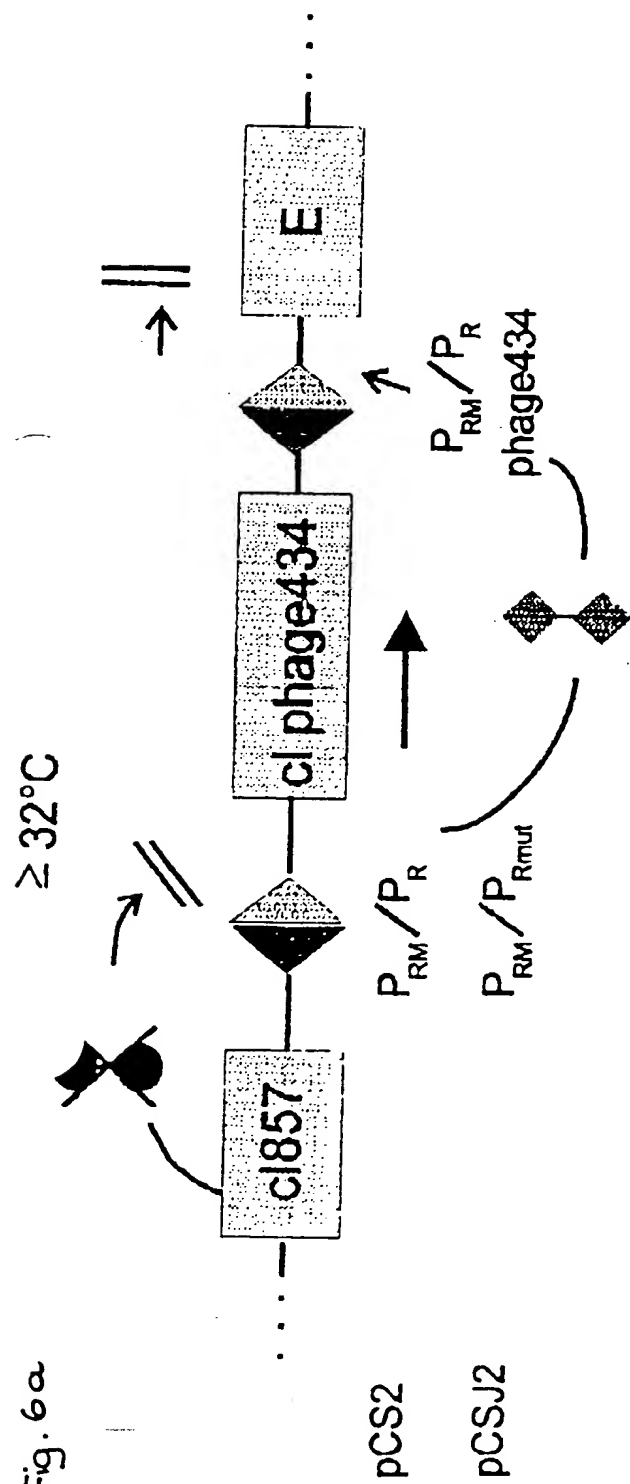
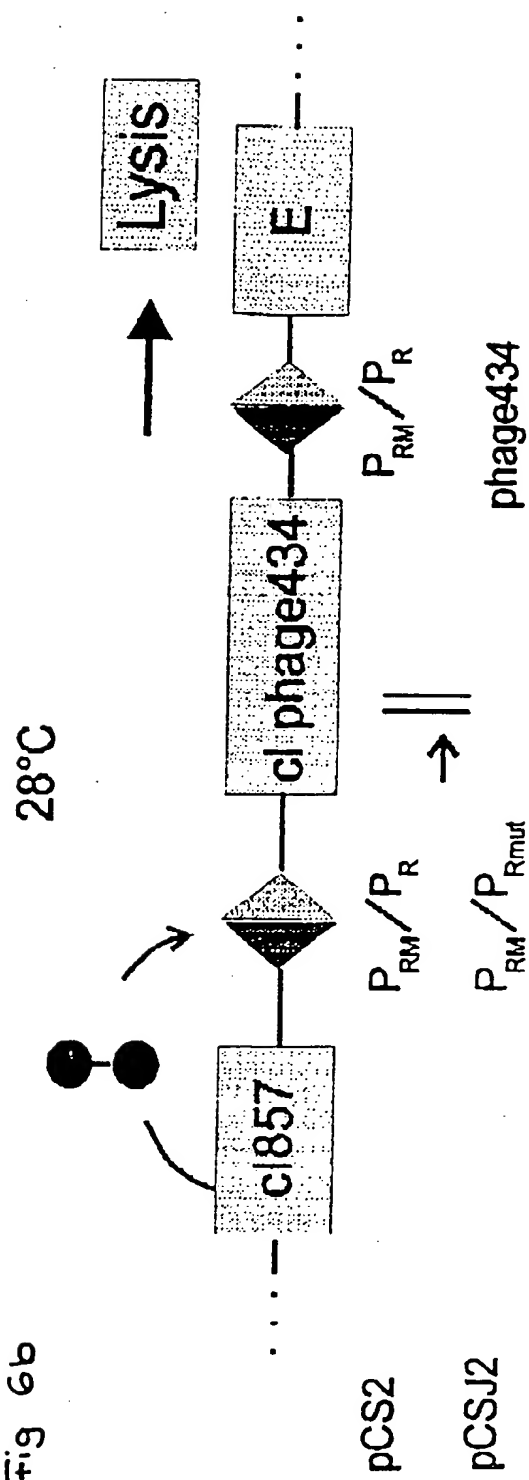


Fig 6b



(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Prof. Dr. Werner Lubitz
- (B) STRASSE: Schoenborngasse 12/7
- (C) ORT: Wien
- (E) LAND: Oesterreich
- (F) POSTLEITZAHL: 1080

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neue Systeme zur Regulation der Genexpres

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(-) ABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 82 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Lambda-OR-Operator (Wildtyp)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ACGTTAAATC TATCACCGCA AGGGATAAAT ATCTAACACC GTGCGTGTTG ACTATTTTAC 60

CTCTGGCGGT GATAATGGTT GC 82

(2) ABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 82 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Lambda-OR-Operator (Mutante)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ACGTTAAATC TATCACCGCA AGGGATAAAT ATCTAACACC GCGCGTGTTG ACTATTTTAC 60

CTCTGGCGGT GATAATGGTT GC 82

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 85 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Lambda-OL-Operator (Wildtyp)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ACATACAGAT AACCATCTGC GGTGATAAAT TATCTCTGGC GGTGTTGACA TAAATACCAC	60
TGGCGGTGAT ACTGAGCACA TCAGC	85

(Linear) MAP of: pAW12/10 fragment from: 1 to: 1601

July 29, 1996 16:47 ..

```

1  ATTTACTATGTTATGTTCTGAGGGGAGTGAAAATTCCCCTAATTCGATGAAGATTCTTGC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
60 TAAATGATACAATACAAGACTCCCCTCACTTTTAAGGGGATTAAGCTACTTCTAAGAACG

   TCAATTGTTATCAGCTATGCGCCGACCAGAACACCTTGCCGATCAGCCAAACGTCTCTTC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
   AGTTAACAATAGTCGATACGCGGCTGGTCTTGTGGAACGGCTAGTCGGTTTGCAGAGAAG

                                           * G F T E E

   AGGCCACTGACTAGCGATAACTTTCCCCACAACGGAACAACCTCTCATTGCATGGGATCAT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
   TCCGGTGACTGATCGCTATTGAAAGGGGTGTTGCCCTTGTTGAGAGTAACGTACCCTAGTA

       P W Q S A I V K G V V S C S E N C P I M

   TGGGTACTGTGGGTTTGTAGTGGTTGTAAAAACACCTGACCGCTATCCCTGATCAGTTTCTT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
   ACCCATGACACCCAAATCACCAACATTTTGTGGACTGGCGATAGGGACTAGTCAAAGAA

       P Y Q P N L P Q L F V Q G S D R I L K K

   GAAGGTAAACTCATCACCCCCAAGTCTGGCTATGCAGAAATCACCTGGCTCAACAGCCTG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
   CTTCCATTTGAGTAGTGGGGTTTCAGACCGATACGTCTTTAGTGGACCGAGTTGTCGGAC

       F T F E D G G L R A I C F D G P E V A Q

   CTCAGGGTCAACGAGAATTAAACATTCCGTCAGGAAAGCTTGGCTTGGAGCCTGTTGGTGC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
   GAGTCCCASTTGCTCTTAATTGTAAGGCAGTCCTTTTGAACCGAACCTCGGACAACCACG

       E P D V L I L M G D P F S P K S G T P A

   GGTCATGGAATTACCTTCAACCTCAAGCCAGAATGCAGAATCACTGGCTTTTTTGGTTGT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
   CCAGTACCTTAATGGAAGTTGGAGTTCGGTCTTACGTCTTAGTGACCGAAAAACCAACA

       T M S N G E V E L W F A S D S A K K T T

   GCTTACCCATCTCTCCGCATCACCTTTGGTAAAGGTTCTAAGCTTAGGTGAGAACATCCC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
   CGAATGGGTAGAGAGGCGTAGTGGAACCATTTCCAAGATTGGAATCCACTCTTGTAGGG

       S V W R E A D G K T F T R L K P S F M G

   TGCCTGAACATGAGAAAAAACAGGGTACTCATACTCACTTCTAAGTGACGGCTGCATACT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
   ACGGACTTGTACTCTTTTTTGTCCCATGAGTATGAGTGAAGATTCACTGCCGACGTATGA

       A Q V H S F V P Y E Y E S R L S P Q M S
```

AACCGCTTCATACATCTCGTAGATTTCTCTGGCGATTGAAGGGCTAAATTCTTCAACGCT  
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600  
 TTGGCGAAGTATGTAGAGCATCTAAAGAGACCGCTAACTTCCCGATTTAAGAAGTTGCGA  
  
 V A E Y M E Y I E R A I S P S F E E V S  
  
 AACTTTGAGAATTTTTGTAAGCAATGCGGCGTTATAAGCATTTAATGCATTGATGCCATT  
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660  
 TTGAAACTCTTAAAAACATTTCGTTACGCCGCAATATTCGTAAATTACGTAACTACGGTAA  
  
 V K L I K T L L A A N Y A N L A N I G N  
  
 AAATAAAGCACCAACGCCTGACTGCCCCATCCCCATCTTGTCTGCGACAGATTCTCTGGGA  
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720  
 TTTATTTTCGTGGTTGCGGACTGACGGGGTAGGGGTAGAACAGACGCTGTCTAAGGACCCT  
  
 F L A G V G S Q G M G M K D A V S E Q S  
  
 TAAGCCAAGTTCATTTTTCTTTTTTTCATAAATTGCTTTAAGGCGACGTGCGTCCTCAAG  
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780  
 ATTCGGTTCAAGTAAAAAGAAAAAAGTATTTAACGAAATTCGCTGCACGCAGGAGTTC  
  
 L G L E N K K K E Y I A K L R R A D E L  
  
 CTGCTCTTGTGTTAATGGTTTCTTTTTTGTGCTCATACGTTAAATCTATCACCGCAAGGG  
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840  
 GACGAGAACACAATTACCAAAGAAAAAACACGAGTATGCAATTTAGATAGTGGCGTTCCC  
  
 Q E Q T L P K K K T S M  
  
 ATAAATATCTAACACCGCGCGTGTGACTATTTTACCTCTGGCGGTGATAATGGTTGCAT  
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900  
 TATTTATAGATTGTGGCGGCACAACTGATAAATGGAGACCGCCACTATTACCAACGTA  
  
  
 GTACTAAGTAGGTTGTATGGAACAACGCATAACCCTGAAAGATTATGCAATGCGCTTTGG  
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960  
 CATGATTCATCCAACATACCTTGTGCGTATTTGGGACTTTCTAATACGTTACGCGAAAC  
  
  
 GCAAACCAAGACAGCTAAAGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTATCGAA  
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020  
 CGTTTGTGTTCTGTCGATTTCTAGGAGATCTCAGCTGGACGTCCGTACGTTCAATAGCTT  
  
  
 TTCTCATTCAGGCTTCTGCCGTTTTGGATTTAACCGAAGATGATTTTCGATTTTCTGACGA  
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080  
 AAGAGTAAGTCCGAAGACGGCAAAACCTAAATTTGGCTTCTACTAAAGCTAAAAGACTGCT  
  
  
 GTAACAAAGTTTGGATTGCTACTGACCGCTCTCGTGCTCGTCGCTGCGTTGAGGCTTGCG  
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140  
 CATTGTTTCAAACCTAACGATGACTGGCGAGAGCACGAGCAGCGACGCAACTCCGAACGC

```

TTTATGGTACGCTGGACTTTGTGGGATACCCTCGCTTTCCTGCTCCTGTTGAGTTTATTG
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
AAATACCATGCGACCTGAAACACCCTATGGGAGCGAAAGGACGAGGACAACCTCAAATAAC

    M V R W T L W D T L A F L L L L S L L

CTGCCGTCATTGCTTATTATGTTTCATCCCGTCAACATTCAAACGGCCTGTCTCATCATGG
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
GACGGCAGTAACGAATAATACAAGTAGGGCAGTTGTAAGTTTGCCGGACAGAGTAGTACC

    L P S L L I M F I P S T F K R P V S S W

AAGGCGCTGAATTTACGGAAAACATTATTAATGGCGTCGAGCGTCCGGTTAAAGCCGCTG
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
TTCCGCGACTTAAATGCCTTTTGTAAATAATTACCGCAGCTCGCAGGCCAATTTCCGGCGAC

    K A L N L R K T L L M A S S V R L K P L

AATTGTTTCGCGTTTACCTTGCGTGACGCGCAGGAAACACTGACGTTCTTACTGACGCAG
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
TTAACAAGCGCAAATGGAACGCACATGCGCGTCCTTTGTGACTGCAAGAATGACTGCGTC

    N C S R L P C V Y A Q E T L T F L L T Q

AAGAAAACGTGCGTCAAAAATTACGTGCAGAAGGAGTGATGTAATGTCTAAAGGTAAAAA
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
TTCTTTTGCACGCAGTTTAAATGCACGTCCTTCTCACTACATTACAGATTTCCATTTTT

    K K T C V K N Y V Q K E *

ACGTTCTGGCGCTCGCCCTGGTTCGTCGCGCAGCCGTTGCGAGGTACTAAAGGCAAGCGTAA
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
TGCAAGACCGCGAGCGGGACCAGCAGGCGTCGGCAACGCTCCATGATTTCCGTTTCGATT

    AGGCGCTCGTCTTTGGTATGTAGGTGGTCAACAATTTTAATTGCAGGGGCTTCGGCCCTT
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
TCCGCGAGCAGAAAACCATACATCCACCAGTTGTTAAAATTAACGTCCCCGAAGCCGGGAA

    ACTTGAGGATAAAATTATGTCTAATATTCAAACCTGGCGCCGA
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1601
TGAACCTCCTATTTAATACAGATTATAAGTTTGACCGCGGCT

```

Koordinaten:

pAW12/10: 1-983      Lambda: 37125-38107 (Sanger et al., 1982)  
pAW12/10: 1023-1601    PhiX174: 447-1026 (Sanger et al., 1978)

Mutation:    pAW12/10: 858 (C, in Lambda wt ein T)

(Linear) MAP of: pCSJ fragment from: 1 to: 2834

1 ATTTACTATGTTATGTTCTGAGGGGAGTGAAAATTCCCCTAATTCGATGAAGATTCTTGC 60  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
TAAATGATACAATAACAAGACTCCCCTCACTTTTAAGGGGATTAAGCTACTTCTAAGAACG

61 TCAATTGTTATCAGCTATGCGCCGACCAGAACACCTTGCCGATCAGCCAAACGTCTCTTC 120  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
AGTTAACAATAGTCGATACGCGGCTGGTCTTGTGGAACGGCTAGTCGGTTTGCAGAGAAG

\* G F T E E

121 AGGCCACTGACTAGCGATAACTTTCCCCACAACGGAACAACCTCTCATTCGATGGGATCAT 180  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
TCCGCTGACTGATCGCTATTGAAAGGGGTGTTGCCTTGTTGAGAGTAACGTACCCTAGTA

P W Q S A I V K G V V S C S E N C P I M

181 TGGGTACTGTGGGTTTAGTGTTGTAAAAACACCTGACCGCTATCCCTGATCAGTTTCTT 240  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
ACCCATGACACCCAAATCACCAACATTTTTGTGGACTGGCGATAGGGACTAGTCAAAGAA

P Y Q P N L P Q L F V Q G S D R I L K K

241 GAAGGTAAACTCATCACCCCCAAGTCTGGCTATGCAGAAATCACCTGGCTCAACAGCCTG 300  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
CTTCCATTTGAGTAGTGGGGGTTTCAGACCGATACGTCTTTAGTGGACCGAGTTGTCGGAC

F T F E D G G L R A I C F D G P E V A Q

301 CTCAGGGTCAACGAGAATTAACATTCCGTCAGGAAAGCTTGGCTTGGAGCCTGTTGGTGC 360  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
GAGTCCCAGTTGCTCTTAATTGTAAGGCAGTCTTTTCGAACCGAACCTCGGACAACCACG

E P D V L I L M G D P F S P K S G T P A

361 GGTCAATGGAATTACCTTCAACCTCAAGCCAGAATGCAGAATCACTGGCTTTTTTGGTTGT 420  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
CCAGTACCTTAATGGAAGTTGGAGTTTCGGTCTTTACGTCTTAGTGACCGAAAAACCAACA

T M S N G E V E L W F A S D S A K K T T

421 GCTTACCCATCTCTCCGCATCACCTTTGGTAAAGGTTCTAAGCTTAGGTGAGAACATCCC 480  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
CGAATGGGTAGAGAGGCGTAGTGGAACCATTTCCAAGATTTCGAATCCACTCTTGTAGGG

S V W R E A D G K T F T R L K P S F M G

481 TGCCTGAACATGAGAAAAAACAGGGTACTCATACTCACTTCTAAGTGACGGCTGCATACT 540  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
ACGGACTTGTACTCTTTTTGTCCCATGAGTATGAGTGAAGATTCACTGCCGACGTATGA

A Q V H S F V P Y E Y E S R L S P Q M S

541 AACCGCTTCATACATCTCGTAGATTTCTCTGGCGATTGAAGGGCTAAATTCTTCAACGCT 600  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
TTGGCGAAGTATGTAGAGCATCTAAAGAGACCGCTAACTTCCCGATTGAAGAAGTTGCGA

V A E Y M E Y I E R A I S P S F E E V S

AACTTTGAGAATTTTTGTAAGCAATGCGGCGTTATAAGCATTTAATGCATTGATGCCATT  
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660  
 TTGAAACTCTTAAAAACATTTCGTTACGCCGCAATATTCGTAAATTACGTAACCTACGGTAA  
  
 V K L I K T L L A A N Y A N L A N I G N  
  
 AAATAAGCACCAACGCCTGACTGCCCCATCCCCATCTTGTCTGCGACAGATTCTCTGGGA  
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720  
 TTTATTTTCGTGGTTGCGGACTGACGGGGTAGGGGTAGAACAGACGCTGTCTAAGGACCCT  
  
 F L A G V G S Q G M G M K D A V S E Q S  
  
 TAAGCCAAGTTCATTTTTCTTTTTTTCATAAATTGCTTTAAGGCGACGTGCGTCCCTCAAG  
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780  
 ATTCGGTTCAAGTAAAAAGAAAAAAGTATTTAACGAAATTCGCTGCACGCAGGAGTTC  
  
 L G L E N K K K E Y I A K L R R A D E L  
  
 CTGCTCTTGTGTTAATGGTTTCTTTTTTGTGCTCATACGTTAAATCTATCACCGCAAGGG  
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840  
 GACGAGAACACAATTACCAAAGAAAAAACACGAGTATGCAATTTAGATAGTGGCGTTCCC  
  
 Q E Q T L P K K K T S M  
  
 ATAAATATCTAACACCGCGCGTGTGACTATTTTACCTCTGGCGGTGATAATGGTTGCAT  
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900  
 TATTTATAGATTGTGGCGCGCACAACTGATAAAATGGAGACCGCCACTATTACCAACGTA  
  
  
 GTACTAAGTAGGTTGTATGGAACAACGCATAACCCTGAAAGATTATGCAATGCGCTTTGG  
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960  
 CATGATTCATCCAACATACCTTGTTGCGTATTGGGACTTTCTAATACGTTACGCGAAACC  
  
  
 GCAAACCAAGACAGCTAAAGATCCTCTAGAGCGCCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGT  
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020  
 CGTTTGGTTCTGTGATTTCTAGGAGATCTCGCGGGCCTTCTCTCAGTTAAGTCCACCA  
  
  
 GAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGCAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGAC  
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080  
 CTTACACTTTGGTCATTGCAATATGCTACAGCGTCTCATACGGCCACAGAGAATAGTCTG  
  
 V K P V T L Y D V A E Y A G V S Y Q T  
  
 CGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGGA  
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140  
 GCAAAGGGCGCACCACTTGGTCCGGTCGGTGCAAAGACGCTTTTGCGCCCTTTTTCACCT  
  
 V S R V V N Q A S H V S A K T R E K V E  
  
 AGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAA  
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200  
 TCGCCGCTACCGCCTCGACTTAATGTAAGGGTTGGCGCACCGTGTGTTGACCGCCCGTT  
  
 A A M A E L N Y I P N R V A Q Q L A G K



ACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAAT  
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260  
 TGTCAGCAACGACTAACCGCAACGGTGGAGGTCAGACCGGGACGTGCGCGGCAGCGTTTA  
 Q S L L I G V A T S S L A L H A P S Q I  
 TGTCGCGGCGGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTTCGATGGT  
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320  
 ACAGCGCCGCTAATTTAGAGCGCGGCTAGTTGACCCACGGTCGCACCACCACAGCTACCA  
 V A A I K S R A D Q L G A S V V V S M V  
 AGAACGAAGCGGCGTGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGT  
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380  
 TCTTGCTTTCGCCGCGAGCTTCGGACATTTGCGCCGCCACGTGTTAGAAGAGCGCGTTGCGCA  
 E R S G V E A C K A A V H N L L A Q R V  
 CAGTGGGCTGATCATTAACCTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGC  
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440  
 GTCACCCGACTAGTAATTGATAGGCGACCTACTGGTCCCTACGGTAACGACACCTTCGACG  
 S G L I I N Y P L D D Q D A I A V E A A  
 CTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTAT  
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500  
 GACGTGATTACAAGGCCGCAATAAAGAACTACAGAGACTGGTCTGTGGGTAGTTGTCATA  
 C T N V P A L F L D V S D Q T P I N S I  
 TATTTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTCGCATTGGGTCA  
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560  
 ATAAAAGAGGGTACTTCTGCCATGCGCTGACCCGCACCTCGTAGACCAGCGTAACCCAGT  
 I F S H E D G T R L G V E H L V A L G H  
 CCAGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGC  
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620  
 GGTCGTTTAGCGCGACAATCGCCCGGGTAATTCAAGACAGAGCCGCGCAGACGCAGACCG  
 Q Q I A L L A G P L S S V S A R L R L A  
 TGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGA  
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680  
 ACCGACCGTATTTATAGAGTGAAGCGTGTAGTTTAAAGTCGGCTATCGCCTTGCCTTCCGCT  
 G W H K Y L T R N Q I Q P I A E R E G D  
 CTGGAGTGCCATGTCCGTTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCC  
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740  
 GACCTCACCGTACAGGCCAAAAGTTGTTTGGTACGTTTACGACTTACTCCCGTAGCAAGG  
 W S A M S G F Q Q T M Q M L N E G I V P  
 CACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGA  
 1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800  
 GTGACGCTACGACCAACGGTTGCTAGTCTACCGCGACCCGCGTTACGCGCGGTAATGGCT  
 T A M L V A N D Q M A L G A M R A I T E

1801 GTCCGGGCTGCGCGTTGGTGCGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAG 1860  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CAGGCCCCGACGCGCAACCACGCCTATAGAGCCATCACCCCTATGCTGCTATGGCTTCTGTC  
  
 S G L R V G A D I S V V G Y D D T E D S  
  
 1861 CTCATGTTATATCCCCCGCTCAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAAC 1920  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GAGTACAATATAGGGCGGCAGTTGGTGGTAGTTTGTCTCTAAAAGCGGACGACCCCGTTTG  
  
 S C Y I P P S T T I K Q D F R L L G Q T  
  
 1921 CAGCGTGGAACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTT 1980  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GTCGCACCTGGCGAACGACGTTGAGAGAGTCCCGGTCCGCCACTTCCCGTTAGTCGACAA  
  
 S V D R L L Q L S Q G Q A V K G N Q L L  
  
 1981 GCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCC 2040  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CGGGCAGAGTGACCACTTTTCTTTTGGTGGGACCGCGGGTTATGCGTTTGGCGGAGAGG  
  
 P V S L V K R K T T L A P N T Q T A S P  
  
 2041 CCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGG 2100  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GGCGCGCAACCGGCTAAGTAATTACGTCGACCGTGCTGTCCAAGGGCTGACCTTTCGCC  
  
 R A L A D S L M Q L A R Q V S R L E S G  
  
 2101 GCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTAC 2160  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CGTCACTCGCGTTGCGTTAATTACACTCAATCGAGTGAGTAATCCGTGGGGTCCGAAATG  
  
 Q \*  
  
 2161 ACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAG 2220  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TGAAATACGAAGGCCGASCATACAACACACCTTAACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGTC  
  
  
 2221 GAAACAGCTCTGCAGGCATGCAAGCTTATCGAATTCTCATTCAAGGCTTCTGCCGTTTTGG 2280  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CTTTGTGCGAGACGTCCGTACGTTTGAATAGCTTAAGAGTAAGTCCGAAGACGGCAAACCC  
  
  
 2281 ATTTAACCGAAGATGATTTTCGATTTTCTGACGAGTAACAAAGTTTGGATTGCTACTGACC 2340  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TAAATTGGCTTCTACTAAAGCTAAAAGACTGCTCATTGTTTCAAACCTAACGATGACTGG  
  
  
 2341 GCTCTCGTGCTCGTCGCTGCGTTGAGGCTTGCGTTTATGGTACGCTGGACTTTGTGGGAT 2400  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CGAGAGCACGAGCAGCGACGCAACTCCGAACGCAAATACCATGCGACCTGAAACACCCTA

M V R W T L W D

```

ACCCTCGCTTTCTCTGCTCCTGTTGAGTTTATTGCTGCCGTCATTGCTTATTATGTTTCATC
2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
TGGGAGCGAAAGGACGAGGACAACCTCAAATAACGACGGCAGTAACGAATAATACAAGTAG

T L A F L L L L S L L L P S L L I M F I

CCGTCAACATTCAAACGGCCTGTCTCATCATGGAAGGCGCTGAATTTACGGAAAACATTA
2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
GGCAGTTGTAAGTTTGCCGGACAGAGTAGTACCTTCCGCGACTTAAATGCCTTTTGTAAT

P S T F K R P V S S W K A L N L R K T L

TTAATGGCGTCGAGCGTCCGGTTAAAGCCGCTGAATTGTTTCGCGTTTACCTTGCGTGTAC
2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
AATTACCGCAGCTCGCAGGCCAATTTCCGCGACTTAACAAGCGCAAATGGAACGCACATG

L M A S S V R L K P L N C S R L P C V Y

GCGCAGGAAACACTGACGTTCTTACTGACGCAGAAGAAAACGTGCGTCAAAAATTACGTG
2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
CGCGTCCTTTGTGACTGCAAGAATGACTGCGTCTTCTTTTGCACGCAGTTTTTAATGCAC

A Q E T L T F L L T Q K K T C V K N Y V

CAGAAGGAGTGATGTAATGTCTAAAGGTAAAAACGTTCTGGCGCTCGCCCTGGTCGTCC
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
GTCTTCCTCACTACATTACAGATTTCCATTTTTTGCAAGACCGCGAGCGGGACCAGCAGG

Q K E *

GCAGCCGTTGCGAGSTACTAAAGGCAAGCGTAAAGGCGCTCGTCTTTGGTATGTAGGTGG
2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
CGTCGGCAACGCTCCATGATTTCCGTTTCGATTTCCGCGAGCAGAAACCATACATCCACC

TCAACAATTTTAATTGCAGGGGCTTCGGCCCTTACTTGAGGATAAATTATGTCTAATATT
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
AGTTGTTAAAATTAACTCCCGGAAGCCGGGAATGAACTCCTATTTAATACAGATTATAA

CAAACCTGGCGCCGA
2821 -----+----- 2834
GTTTGACCGCGGCT

```

Koordinaten:

pCSJ: 1-983	Lambda: 37125-38107 (Sanger et al., 1982)
pCSJ: 990-2230	LacI von pMC7 (Calos, 1978)
pCSJ: 2256-2834	PhiX174: 447-1026 (Sanger et al., 1978)

Mutation: pCSJ: 858 (C, in Lambda wt ein T)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**